

E. Sales^{1*} · J. Viruel¹ · C. Domingo² · M. Talón² · L. Marqués³

TOLERANCIA AL ESTRÉS POR FRÍO EN GERMINACIÓN DE VARIEDADES DE ARROZ JAPÓNICA DE ZONAS TEMPLADAS

¹ Escuela Politécnica Superior,
Universidad de Zaragoza.
Ctra. Cuarte s/n
22071 Huesca.

² Instituto Valenciano de
Investigaciones Agrarias.
Ctra. Moncada - Náquera km 4,5
46113 Moncada.

³ COPSEMAR, S.C.L.,
Cooperativa de Productores de
Semillas de Arroz, S.C.L.
Avda. del Mar 1
46410 Sueca.

Introducción

El arroz (*Oryza sativa* L.) es el cultivo más importante del mundo en relación a la alimentación humana, puesto que ocupa el 11% de la superficie total cultivable y representa el alimento base de más del 50% de la población mundial. Según las estadísticas oficiales, la superficie sembrada de arroz en España en 2010 fue de unas 122.000 Ha. Aproximadamente la mitad de esta superficie se siembra con variedades de grano corto o medio perlado (Bomba, Fonsa, Gleva, Jsendra, Thaiperla,...) o semilargo cristalino (Guadiamar), mientras que la otra mitad está sembrada con variedades de grano largo (Thaibonet, Puntal, Gladio,...). Se ha venido observando una cierta tendencia al aumento de la producción de arroz de grano corto y medio perlado, dado que en los últimos años en los mercados de exportación tradicionales existe una fuerte competencia con el arroz de grano largo procedente de países terceros.

La mayor parte de los programas de mejora genética de arroz tienen como objetivo final la obtención de una línea pura para ser explotada como variedad comercial, aunque existen variedades híbridas (de tipos *índica*) principalmente en China, India, Filipinas y Vietnam. Los mejoradores de arroz han tenido mucho éxito empleando métodos genealógicos de selección, en los cuales el acierto en la elección de los progenitores más adecuados es fundamental. Para ello se precisa una completa y rigurosa caracterización del germoplasma (Guimaraes, 2009). Junto a la caracterización morfológica y agronómica de los recursos fitogenéticos disponibles, los mejoradores de arroz cuentan con herramientas biotecnológicas para la caracterización genética a nivel molecular.

El arroz es la primera especie cultivada cuyo genoma (430 Mb, $2n=24$) ha sido completamente secuenciado (Yu *et al.*, 2002; Goff *et al.*, 2002), encontrándose a disposición de investigadores y mejoradores en las bases de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, EEUU) y en Gramene (www.gramene.org). Además, se han desarrollado numerosos marcadores moleculares asociados a diferentes caracteres de interés, como resistencia a patógenos, tolerancia a estrés abiótico, etc., que han sido de aplicación directa en la mejora genética de este cultivo (Jena y Mackill, 2008). De entre los diferentes marcadores moleculares disponibles, los microsatélites (*Simple Sequence Repeats*, SSR) han sido los más ampliamente empleados, por ejemplo

han permitido conocer la existencia de una mayor diversidad genética entre los cultivares *índica* que entre los *japónica* (Junjian *et al.*, 2002). Más recientemente, la secuenciación del genoma ha permitido identificar más de 200.000 polimorfismos de una sola base (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) (*Oryza SNP Project*) que permiten distinguir variaciones génicas con muy buena resolución, por lo se han impuesto en los estudios genéticos actuales.

En este contexto, el consorcio formado por COPSEMAR, el IVIA y la Universidad de Zaragoza está llevando a cabo un proyecto de investigación, financiado por el MINECO, con el doble objetivo de desarrollar herramientas genómicas para la mejora de las variedades de arroz en el área mediterránea y de aplicar dichas herramientas en la obtención de líneas avanzadas para su cultivo y comercialización.

En la actualidad, para la mejora del arroz se buscan nuevas fuentes de variación que permitan incrementar la resistencia a plagas y enfermedades y la tolerancia a estreses, así como mejorar el rendimiento potencial y la calidad, entre otras características (Aguilar-Portero *et al.*, 2005). Las variedades de tipo *japónica* adaptadas al clima mediterráneo presentan en general como deficiencias la larga duración del ciclo, la susceptibilidad a enfermedades y la baja tolerancia a condiciones ambientales desfavorables, particularmente a las bajas temperaturas durante la nascencia.

Para germinar el arroz necesita un mínimo de 10-13°C, situándose el óptimo en 30-35°C. Temperaturas inferiores a 15°C durante esta fase reducen el crecimiento y se traducen generalmente en porcentajes menores de plántulas arraigadas. Esta problemática es más relevante en regiones españolas con clima templado, como en Levante y, particularmente, en Navarra y Aragón. Así ha ocurrido este año con unas condiciones climáticas adversas, bajas temperaturas combinadas con episodios de fuertes vientos, que han ocasionado problemas de arraigo durante los primeros estadios del cultivo.

Existe entre las formas cultivadas y silvestres del arroz una amplia variación genética para la tolerancia al frío. Dicha variación está asociada a su distribución geográfica, lo cual indica que se trata de una adaptación a las condiciones climáticas de cada región (Baruah *et al.*, 2009). Los cultivares japónica son en general los que muestran mayor tolerancia al frío en la germinación y en los primeros estadios de desarrollo. Variedades como 'Italica Livorno' y 'Arroz da Terra' han mostrado el mejor comportamiento en cuanto al establecimiento de las plántulas en ensayos de siembra directa (Inoue *et al.*, 1997), especialmente en condiciones de baja temperatura (Hagiwara e Imura, 1993).

La mayor parte de los programas de mejora realizados hasta el momento se ha centrado en cruzamientos *Índica* x *japónica*, puesto que el objetivo era mejorar la tolerancia al frío de las variedades *índica*, de forma que se pueda extender su zona de cultivo en países como Japón, China o EEUU. En estas investigaciones se ha detectado un gen mayor, el *Ltg(t)* (*Low Temperature Germination*) que sería responsable de la mayor germinación a 15°C del cultivar 'Italica Livorno' (Fujino, 2004). Sin embargo, la tolerancia al frío es, en general, un carácter que muestra variación continua en el arroz, estando su regulación genética distribuida en numerosas regiones del genoma (Ji *et al.*, 2009). Multitud de genes constituirían pues la base de un mecanismo adaptativo complejo, que puede variar según la fase de desarrollo (germina-

ción, plúmula, plántula). El control cuantitativo del carácter y las dificultades en su evaluación frenan una selección efectiva por parte de los mejoradores.

Nuestro trabajo persigue: (1) identificar entre las variedades de arroz cultivadas en las zonas templadas aquellas que muestran mayor tolerancia al frío durante la germinación, y que por tanto serían progenitores útiles para la mejora; (2) esclarecer el mecanismo genético de dicha tolerancia, detectando las regiones del genoma asociadas a este carácter y (3) desarrollar marcadores ligados a dichas regiones que faciliten la selección en los programas de mejora. En el marco de esta línea de investigación, presentamos los primeros resultados obtenidos en la evaluación de la tolerancia al frío durante la germinación de 102 variedades de arroz.

Material y métodos

El material vegetal empleado en este trabajo fueron 102 variedades de arroz originarias de zonas templadas. Las semillas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito sódico al 1% durante 10 minutos, y seguidamente se lavaron 3 veces en agua destilada estéril hasta obtener una hora de imbibición. Finalmente se dispusieron sobre doble capa de papel de filtro humedecido con 9 ml de agua destilada estéril, incluidas en Placas de Petri con una abertura en la tapa de 3 mm de diámetro para evitar una condensación excesiva. Cada placa contenía 25 semillas, realizándose tres réplicas por cada variedad. Las semillas se incubaron en una cámara de crecimiento (CONVIRON ADAPTIS A1000) para monitorizar la germinación en condiciones control y de frío, a 26 y a 15°C, respectivamente. En ambos casos se fijó un 70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 14 horas de luz.

Se realizó el conteo de semillas germinadas y se midió la longitud del coleoptilo desde su emisión y hasta 10 días en el ensayo a 26°C, mientras que a 15°C se mantuvo durante 21 días. De esta forma, para cada variedad se determinó el porcentaje de semillas que germinaron, el porcentaje de semillas

que produjeron plántulas viables y la velocidad de crecimiento del coleoptilo (mm/día). Se consideraron plántulas viables aquellas que al finalizar el ensayo de germinación mostraban un coleoptilo de al menos 6 mm de longitud. Para evaluar la tolerancia al frío durante la germinación se obtuvo el ratio entre las velocidades de crecimiento del coleoptilo a 15 y a 26°C. Dado que la varianza no fue homogénea entre variedades para las tres variables estudiadas (prueba de Levene $P < 0,001$), la hipótesis nula de igualdad de respuesta entre variedades se comprobó mediante el test H de Kruskal-Wallis. La homogeneidad de grupos se analizó mediante el test de Tukey.

Resultados

La respuesta de las semillas dependió de la temperatura del ensayo y de la variedad, así como de la interacción entre ambos factores ($P < 0,001$). En el ensayo control a 26°C prácticamente todas las variedades mostraron porcentajes de germinación superiores al 90%, a excepción de 'Azucena' (73%) e 'Irat-320' (80%). Estas dos variedades también mostraron valores significativamente inferiores en cuanto al porcentaje de producción de plantas viables (67 y 79%, respectivamente), mientras que los valores determinados en las demás variedades fueron superiores al 85%.

En el ensayo a 15°C se observó mayor variabilidad en la respuesta de las variedades, puesto que el porcentaje de germinación se vio significativamente reducido en algunas (por ejemplo solo germinó el 5% de las semillas de la variedad 'Agami'). Sin embargo, la mayor parte de las variedades mostraron porcentajes de germinación superiores al 79%. Las diferencias significativas más evidentes se observaron cuando se estudió el porcentaje de producción de plantas viables, ya que en la mayor parte de las variedades las semillas que germinaron formaron en tres semanas un coleoptilo de pocos mm de longitud, mientras que otras dieron lugar a plántulas viables, aquellas cuyos tallos crecieron a partir de 6 mm (Figura 1).

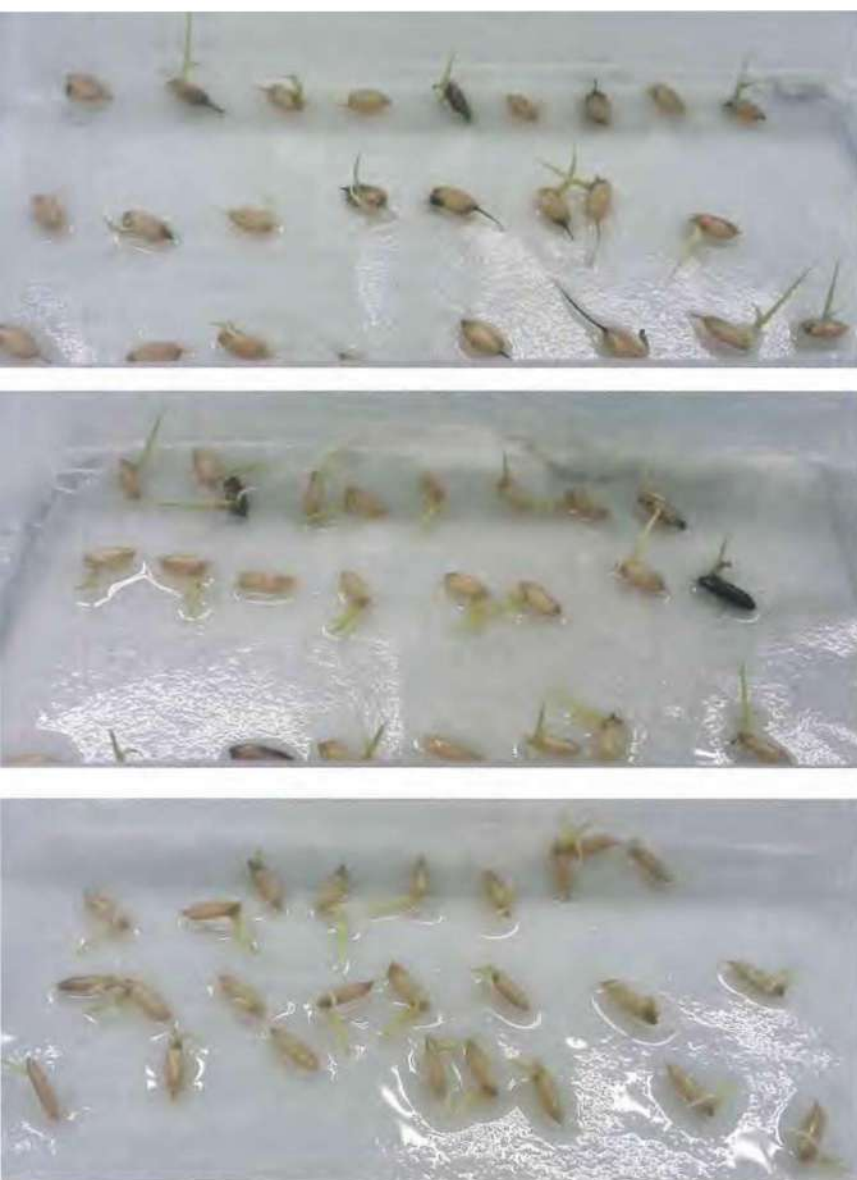


Figura 1. Semillas de las variedades 'Itálica Livorno', 'Savio' y 'Urano' tras 16 días de ensayo de germinación a 15 °C.



Figura 3. Semillas de la variedad 'M202' tras 10 días de ensayo de germinación a 26 °C.

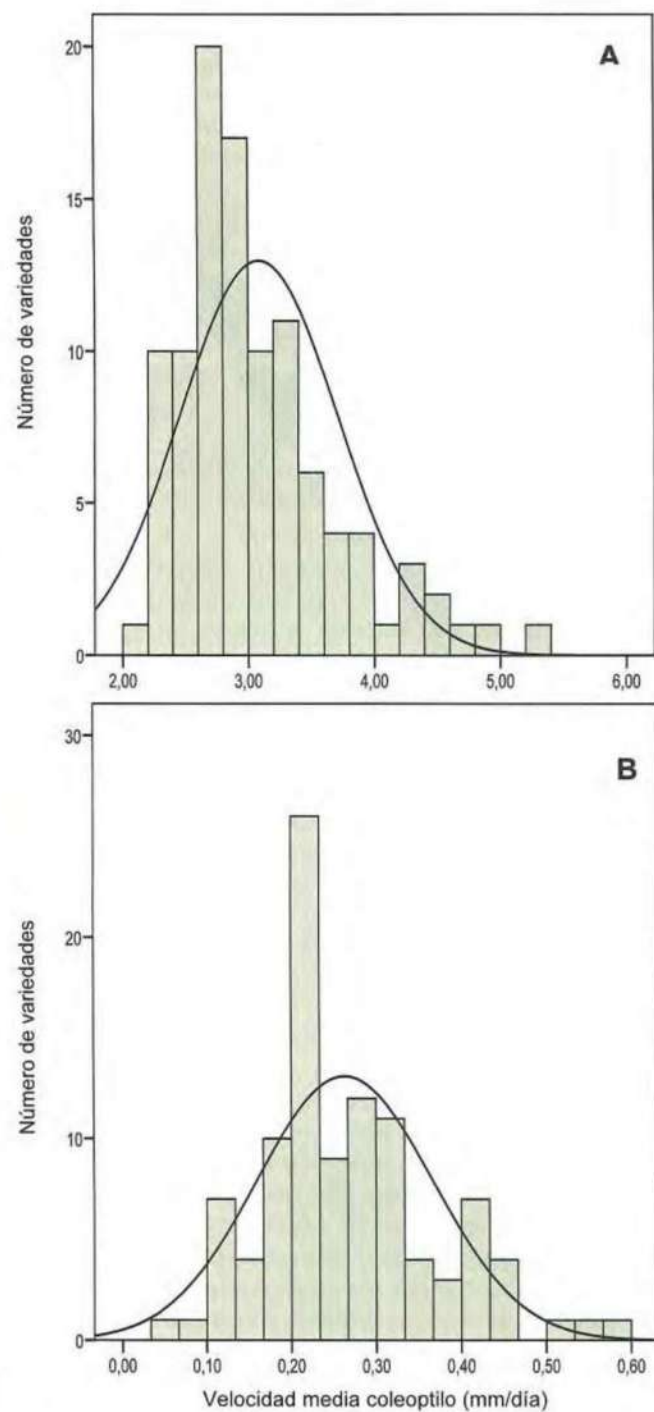


Figura 2. Frecuencias observadas para la velocidad media de crecimiento del coleoptilo (mm/día) durante la germinación de 102 variedades de arroz japónica ensayadas a 26°C (A) y a 15°C (B).

Por ejemplo las variedades 'Azucena', 'CNA6159', 'Co39', 'Irat339' y 'Lemont', así como dos variedades indica, 'CT13432' y 'Oryza llanos 5', no produjeron ninguna plántula viable, mientras que en otras como 'Ducato', 'Eridano', 'Fast', 'Italica Livorno', 'Savio' y 'Urano' este porcentaje superó el 90%.

En cuanto a la velocidad de crecimiento del coleoptilo, los valores variaron de forma continua con un valor promedio a 26°C de $3,08 \pm 0,63$ mm/día (Figura 2A) y oscilando entre los 2,15 mm/día de la variedad 'Drago' y los 5,31 mm/día de la variedad 'Italica Livorno'. En la gran mayoría de las variedades las semillas emitieron el coleoptilo tras dos días y produjeron plántulas de al menos 6 mm de longitud al cabo de 4-6 días, alcanzando unos 20-30 mm al finalizar el ensayo (Figura 3). La variedad 'Italica Livorno' mostró un crecimiento durante la germinación más rápido que el de la mayor parte de las variedades, aunque en el ensayo no se encontraron diferencias significativas entre esta variedad y la respuesta observada en otras variedades como 'IR64', 'Taichung65', 'Loto', 'IRAT350' o 'Marisma'.

La velocidad media de crecimiento del coleoptilo se redujo significativamente cuando las variedades se ensayaron a 15°C (Figura 2B), obteniéndose un promedio de $0,26 \pm 0,11$ mm/día. Nuevamente se observaron diferencias significativas entre variedades, siendo 'Italica Livorno' la variedad con mejor respuesta (0,56 mm/día), aunque ésta no difirió del crecimiento observado en las variedades 'Ducato', 'Sivert' o 'Nuevo Maratelli', entre otras. En estas cuatro variedades los porcentajes de producción de plántulas viables oscilaron entre el 91% ('Nuevo Maratelli') y el 100% ('Sivert'), alcanzando al final del ensayo dichas plantas una longitud promedio de entre 11,3 mm ('Italica Livorno') y 12,3 mm ('Sivert').

Cuando se estudió la tolerancia al frío, sin embargo, los mayores ratios de mantenimiento de la velocidad de crecimiento se estimaron para las

variedades 'Ducato', 'Sivert', 'Gavina', 'Guweoldo' y 'Bombita'. En estas variedades, la reducción de la velocidad de crecimiento en condiciones de frío fue del 79-85%, frente al 92% promedio.

Discusión

La germinación de las semillas de arroz se vio severamente afectada en condiciones de frío, reduciéndose la capacidad de germinación y en mayor medida la velocidad de crecimiento del coleoptilo, de forma que en la mayor parte de las variedades las semillas no dieron lugar a plántulas viables en porcentajes similares a los observados en el ensayo a 26°C. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre variedades en cuanto al vigor en germinación, tanto a 26 como a 15°C, siendo además la respuesta de cada variedad significativamente afectada por la temperatura.

En general, las variedades que mayor vigor mostraron durante la germinación a 15°C fueron de origen italiano, lo que confirmó la hipótesis de que este carácter es el resultado de la adaptación local de las variedades (Baruah *et al.*, 2009). Especialmente interesante es el comportamiento de la variedad 'Italica Livorno', que mostró el crecimiento más rápido tanto en condiciones control como de frío, a pesar de que la velocidad de crecimiento del coleoptilo a 15°C se redujo un 91% respecto al ensayo a 26°C. Es decir, su mejor implantación en campo en condiciones limitantes podría explicarse más por su vigor que por una verdadera tolerancia al frío. Otras variedades mantuvieron en mayor medida la tasa de crecimiento del coleoptilo cuando se ensayaron a 15°C, lo cual permitió observar en estas condiciones velocidades similares a las de 'Italica Livorno'. Por el contrario, la variedad portuguesa 'Arroz da Terra', también descrita como tolerante al frío en germinación, mostró en nuestro ensayo valores intermedios para la velocidad del crecimiento del coleoptilo (0,29 y 3,13 mm/día a 15 y 26°C, respectivamente).

Aunque se requieren mayores comprobaciones, estos resultados suponen un punto de partida en la identificación de progenitores potencialmente interesantes para la mejora de las variedades de arroz destinadas a su cultivo en el Levante español. La amplia variación observada en nuestros ensayos abre la posibilidad de seleccionar variedades con mejor aptitud para el establecimiento en campo, tanto en condiciones óptimas como a bajas temperaturas.

Agradecimientos

Este proyecto está financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, convocatoria INNPACTO (referencia IPT-2011-1244-010000).

Referencias

- Aguilar-Portero M, Castejón M, Lara I (2005). Identificación de las razas de *Pyricularia oryzae* en la zona arrocería de las marismas del Guadalquivir. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía.
- Baruah AR, Ishigo-Oka N, Adachi M, Oguma Y, Tokizono Y, Onishi K, Sano Y (2009). Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice. *Euphytica* 165: 459-470.
- Fujino K (2004). A major gene for low temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 136: 63-68.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H. *et al.* (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296: 92-100.
- Guimaraes EP (2009). Rice breeding. En: Handbook of plant breeding. Cereals (Carona MJ, ed.). Springer, Berlin/Heidelberg, Alemania.
- Hagiwara M, Imura M (1993). Varietal difference and temperature response of local soil-reduction around germinating rice seed. *Japanese Journal of Crop Science* 62: 105-110.
- Inoue N, Amano T, Khoko K (1997). Seedling establishment of rice sown on soil surface in flooded paddy field. *Japanese Journal of Crop Science* 66: 632-639.
- Jena KK, Mackill DJ (2008). Molecular markers and their use in marker-assisted selection in rice. *Crop Science* 48: 1266-1276.
- Ji SL, Jiang L, Wang YH, Zhang W W, Liu X, Liu S J, Chen L M, Zhai H Q, Wan J M (2009). Quantitative trait loci mapping and stability for low temperature germination ability of rice. *Plant Breeding* 128: 387-392.
- Junjian N, Colowit PM, Mackill DJ (2002). Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. *Crop Science* 42: 601-607.
- Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X *et al.* (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296: 79-92.